

Synthetic mammalian gene control systems

Doctoral Thesis**Author(s):**

Greber, David Geoffrey

Publication date:

2010

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006317429>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 19338

Synthetic mammalian gene control systems

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

David Geoffrey Greber

BSc (Hons) / LLB (Hons), ANU

born November 25, 1975

citizen of Reichenbach im Kandertal (BE)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner

Prof. Dr. Jörg Stelling, co-examiner

2010

Abstract

While biologists have been transplanting genes from one species to another for more than 30 years, it is only recently that genetic engineering has begun moving from a craft to a true engineering discipline. This has been partly driven by an increase in our understanding of gene function, which has greatly expanded the repertoire of genetic interventions at our disposal, but also by the necessity to tightly control and tailor gene expression. Nowhere is this more critical than for future applications of gene therapy which will require robust and increasingly sophisticated tools to control gene expression within a mammalian context. This work describes the development of three such tools that will one day enable the engineered control of cellular function to become a viable reality.

- With our ever increasing genetic knowledge, it is becoming clear that therapeutic applications will require technology capable of modulating multiple genetic manipulations in which some genes are over-expressed, others down-regulated, or just as likely, a combination of both. Using synthetic introns as a source of encoding siRNA, a tool capable of simultaneously expressing both a transgene and siRNA from a single operon is presented. Extending the concept, the co-expression of up to three different transgenes and three different siRNAs from a single compact construct is demonstrated.
- Applications of conditional gene expression increasingly require mammalian gene control systems that exhibit far tighter control properties. Here, a generically applicable approach is described that utilizes intronically encoded siRNA on the relevant transregulator construct, and siRNA sequence-specific tags on the reporter construct, to minimize basal gene "leakiness" in the off-state of a range of common gene control systems. Also demonstrated is how such improved systems can significantly improve the performance of synthetic gene networks, such as the epigenetic toggle switch.
- The re-assembly of interchangeable DNA parts, whether inside microbes or eukaryotic organisms, has already enabled the creation of a wide range of highly defined and mathematically predictable genetic "devices" that possess increasingly sophisticated functionality. In this context we describe the rational design and characterization of the first mammalian synthetic gene network exhibiting band-pass properties in which transgene expression only occurs within a "band" of input concentrations.

Zusammenfassung

Seit nun mehr als 30 Jahren verwenden Biologen den Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies als Standardmethode. Nichtsdestotrotz entwickelte sich die Gentechnik erst in jüngster Vergangenheit von einer handwerklichen Methode zu einer vollwertigen Ingenieurwissenschaft. Diese Entwicklung wurde einerseits durch das zunehmende Verständnis der Funktion vieler Gene – der Grundlage für jegliche gentechnische Veränderung – und andererseits durch die Notwendigkeit, die Expression eines Genes exakt zu kontrollieren, drastisch vorangetrieben. Vor allem zukünftige gentherapeutische Anwendungen benötigen robuste und zunehmend verbesserte Methoden um die Expression eines Genes in Säugetierzellen zu regulieren. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung dreier solcher Systeme, die eines Tages ermöglichen könnten, dass die konstruierte und vollkommen planbare Kontrolle zellulärer Funktionen Wirklichkeit wird.

- Aus dem stetig wachsenden genetischen Verständnis resultiert die Erkenntnis, dass zukünftige therapeutische Anwendungen auf Technologien basieren werden, die eine parallele Steuerung multipler genetischer Manipulationen, wie Überexpression oder “Knock-down” des Zielgens, wie auch die Kombination beider Regulationen, ermöglichen. Mit Hilfe synthetischer Intron-Sequenzen, die für die Expression von siRNA Molekülen kodieren, wurde eine technologische Plattform entwickelt, die es ermöglicht sowohl das Transgen als auch das siRNA Molekül unter der Kontrolle eines einzigen Operons zu exprimieren. Es wird weiterhin gezeigt, dass dieses Konzept auf bis zu drei verschiedene Transgene und drei verschiedene siRNA Moleküle erweiterbar ist.
- Die Anwendungen der konditionalen, steuerbaren Regulation der Genexpression stellen hohe Anforderungen an die “Dichtheit” des jeweiligen Systems. Diese Arbeit beschreibt einen Ansatz, der intronisch-kodierte siRNA Sequenzen auf dem jeweiligen Transregulator-Konstrukt und siRNA-Sequenz-spezifische TAGs auf dem Reporterkonstrukt verwendet, um die basalen Expressionslevel im AUS-Zustand, die sogenannte “leakiness” oder Undichtigkeit des entsprechenden Genregulationssystems zu minimieren. Es wird weiterhin am Beispiel des epigenetischen Schalters (toggle switch) gezeigt, welchen Einfluss derart optimierte Systeme auf die Leistungsfähigkeit synthetischer Gennetzwerke haben.

- Durch die Remontage einzelner, austauschbarer DNA Module in Mikroben oder eukaryontischen Organismen wurde bereits eine grosse Bandbreite an gut definierten und mathematisch vorhersagbaren genetischen Elementen etabliert, die zunehmend komplexe Aufgaben erfüllen können. In diesem Zusammenhang beschreibt diese Arbeit das erste synthetische Netzwerk in einer Säugetierzelllinie, welches Eigenschaften vergleichbar mit elektrischen Bandpassfiltern aufweist. Das Transgen wird also nur dann exprimiert, wenn die Konzentration des induzierenden Stimulus in einem definierten “Band” liegt.